

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP04/07539

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 31 439.3

RECEIVED

14 SEP 2004

WIPO

PCT

Anmeldetag:

10. Juli 2003

Anmelder/Inhaber:

micromod Partikeltechnologie GmbH,
18119 Rostock/DE

Bezeichnung:

Magnetische Nanopartikel mit verbesserten Magnet-
eigenschaften

IPC:

H 01 F 1/20

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stark

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

23/5



Magnetische Nanopartikel mit verbesserten Magnetelgenschaften

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel, die aus Metalloxid-Polymerkompositen bestehen.

Für magnetische Kompositpartikel mit Durchmessern im Nanometerbereich gibt es bereits eine Reihe von technisch etablierten Applikationen. Beispielsweise können derartige Partikel in molekularbiologischen Applikationen zur Isolierung, Fixierung und Reinigung von Zellen, Zellbestandteilen, Nukleinsäuren, Enzymen, Antikörpern, Proteinen und Peptiden, in der Zellbiologie zu Phagozytose-Untersuchungen, in der Klinischen Chemie als Bestandteil von diagnostischen Assays oder therapeutischen Arzneiformen, in der Klinischen Diagnostik als Kontrastmittel, Radionuklid- oder Drug-Carrier in der Biochemie und Technischen Chemie als Festphasen für die Untersuchung von Molecular Recognition-Phänomenen und heterogenkatalytischen Prozessen eingesetzt werden.

Eine Vielzahl von polymerbeschichteten Metalloxidpartikeln wurden seit Mitte der 1980-er Jahre für biologische Anwendungen in magnetischen Feldern beschrieben. Insbesondere magnetisierbare Nanopartikel unterhalb von 200 nm eröffnen neue Möglichkeiten für den Transport und die Separation von Zellen, Zellbestandteilen, bioaktiven Molekülen und Radionukliden (US2003/0099954 MILTENYI; WO01/17662 ZBOROWSKI; WO02/43708 ALEXIOU), für die Anwendung als Markierung in kontrastgebenden magnetischen Abbildungs- und Diagnoseverfahren (US2003/0092029A1 JOSEPHSON; WO01/74245 JOHANSSON; US5427767 KRESSE) sowie die mechanische (DE10020376A1 KOCH) und thermale Beeinflussung von lebenden Zellen (US6541039 LESNIAK) und sind deshalb ständig in ihren applikationsbezogenen Eigenschaften verbessert worden. Allen Anwendungen ist gemeinsam, dass magnetisierbare Metalloxide mit einer biokompatiblen polymeren Beschichtung zu Kompositpartikeln mit Größen von 5 nm bis 500 nm zu einer kolloidal stabilen Suspension auf wässriger Basis verbunden werden. Dabei soll das Beschichtungsmaterial entweder eine Wechselwirkung mit biologischen Materialien ausschließen, eine gute Verträglichkeit mit lebenden Zellen ermöglichen und die Wege der Metabolisierung in lebenden Organismen beeinflussen oder durch gezielte Funktionalisierung mit biochemisch aktiven Substanzen eine selektive Bindung an der Oberfläche ermöglichen oder kontrolliert

eingeschlossene Substanzen freisetzen. Mittels der magnetisierbaren Anteile der Kompositpartikel wird dabei eine energetische Wechselwirkung mit äußeren magnetischen Feldern genutzt. In magnetischen Feldern erfahren solche Partikel abhängig von den magnetischen Eigenschaften eine Ausrichtung, sie bewegen sich entsprechend räumlicher magnetischer Feldgradienten und reagieren auf zeitliche Änderungen des äußeren Magnetfeldes.

Eine große Anzahl von Methoden wurde zur Herstellung von Eisenoxiddkristalliten als Metalloxydpartikel beschrieben etwa durch Sinterung bei hohen Temperaturen mit anschließender mechanischer Zerkleinerung, Clusterbildung unter Vakuumbedingungen oder nasschemische Synthese aus Lösungen. Die Fällung von Eisenoxiden kann unter nicht-wässrigen Bedingungen erfolgen (US4677027 PORATH) und anschließend in wässrige Bedingungen überführt werden (US5160725 PILGRIM) oder ausschließlich in wässrigen Lösungen erfolgen (US4329241 MASSART). Aus toxikologischen Gründen wird für biologische Anwendungen eine wässrige Formulierung verwendet (US4101435 HASEGAWA). Die nasschemische Synthese der Eisenoxiddkristallite kann einer Beschichtung durch die polymeren Bestandteile vorangehen (Core-shell-Methode) oder in Anwesenheit des Polymers erfolgen (One-pot-Methode). Die Core-shell-Methode macht die Zugabe von Stabilisatoren zu den Eisenoxiden erforderlich, da diese zur Bildung von Aggregaten in wässriger Suspension neigen. Als Stabilisatoren kommen amphiphile Substanzen (WO01/56546 BABINCOVA) oder zusätzliche Nanopartikel mit elektrisch geladener Oberfläche in Betracht (US4280918 HOMOLA). Oberflächenaktive Substanzen als Stabilisatoren können jedoch die Möglichkeiten einer chemischen Funktionalisierung der Oberfläche stark eingrenzen. Heute werden im allgemeinen hauptsächlich nach der One-pot-Methode hergestellte magnetisierbare eisenhaltige Nanokompositpartikel wegen ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften und der pharmazeutischen/galenischen Stabilität für medizinische Anwendungen akzeptiert.

Die One-pot-Methode verwendet das Beschichtungspolymer direkt während der Bildung der Eisenoxide zur Stabilisierung bei Keimbildung und Wachstum der Kristallite aus der Lösung. Eine der meist eingesetzten Beschichtungsmaterialien ist Dextran in verschiedenen Modifizierungen. Aber auch andere Polysaccharide wie Arabinogalactan, Stärke, Glycosaminoglycane oder Proteine fanden Verwendung (US6576221 KRESSE). Das wohl einfachste Verfahren ist die Fällung von Eisen(II)-

und Eisen(III)-Salzen in Gegenwart von Dextran (US4452773 MOLDAY). Abgewandelt wird das Verfahren durch die Verwendung von Ultraschall mit anschließender thermischer Behandlung in einem Durchflussverfahren (US4827945 GROMAN). Die Qualität des Produktes kann durch magnetische Klassierung weiter verbessert werden (WO9007380 MILTENYI). Eine weitergehende Verkapselung/Beschichtung meist unter Verwendung amphiphiler Substanzen als Stabilisatoren kann das Verhalten biologischer Systeme gegenüber den Kompositpartikeln wesentlich modifizieren (US5545395 TOURNIER, EP0272091 ELEY).

Zur Herstellung hoch disperser wässriger Systeme als injizierbare Flüssigkeit kommen neben verschiedenen Stabilisatoren unterstützend spezielle Methoden der Homogenisierung zum Einsatz. Solche Methoden sind beispielsweise die Rotor-Stator-Homogenisierung und die Hochdruckhomogenisierung. Ein besonders hoher mechanischer Energieeintrag wird durch den Einsatz von Liquid-jet- oder Liquid-slot-nozzle-Hochdruckhomogenisatoren erreicht (Microfluidizer-Technologie), was insbesondere zur Herstellung von Liposomen genutzt wird (US5635206 GANTER) aber auch in anderen Fällen die Herstellung injizierbarer Wirkstoffformulierungen erleichtert (US5595687 RAYNOLDS). Der Einsatz eines Hochdruckhomogenisators zur Herstellung oxidischer Nanokompositpartikel mittels kontrollierter Koaleszenz mit anschließender Trocknung in Emulsionen, deren nichtwässrige Komponente eine Oxidkomponente als Sol enthält, ist im Zusammenhang mit der industriellen Herstellung von Katalysatormaterialien (US5304364 COSTA) sowie elektrographischer Tonerpartikel, keramischer Pulver, Filzmaterialien, Sprühschichten, Wirkstoffträger oder Ionenaustauscherharze beschrieben (US5580692 LOFFTUS).

Alle beschriebenen Magnetpartikel-Typen im Größenbereich unterhalb 200 nm sind meist nur über aufwendige Separationsverfahren (z. B. Hochgradienten-Magnetseparation) anzureichern oder zu fixieren.

Andererseits gibt es in den Life Sciences bereits zahlreiche Magnetpartikelapplikationen, die durch Separationsschritte an Permanentmagneten wesentlich effizienter ausgeführt werden könnten oder die aus anderen Gründen eine hohe Magnetomobilität der Partikel erfordern.

Somit lag der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, magnetische Nanopartikel zugänglich zu machen, die über eine genügend hohe Magnetisierung bei kleinen Feldstärken verfügen.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, dass magnetische Nanopartikel bestehend aus einem Metalloxid und einem Polymer mit einem Massenanteil an Metall größer oder gleich 50 % und hydrodynamischen Durchmessern unterhalb 200 nm mittels Hochdruckhomogenisierung aus den Komponenten und einem Trägermedium erzeugt werden.

Diese magnetischen Nanopartikel sind weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass sie bei kleinen Magnetfeldstärken ein vergleichsweise höheres magnetisches Moment als das eingesetzte Metalloxid aufweisen.

Solche magnetische Nanopartikel werden weder durch Amphiphile strukturiert, wie es bei Magnetliposomen der Fall ist, oder durch Tenside stabilisiert, so wie üblicherweise bei Ferrofluiden verfahren wird. Vielmehr bilden sie in Wasser und wässrigen Lösungen ohne Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes ein langzeitstabiles Kolloid.

Bei den eingesetzten Metalloxiden handelt es sich vornehmlich um Eisenoxide, wie Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit (Fe_2O_3) oder daraus resultierenden Mischphasen. Die Eisenoxide können durchaus auch Anteile von anderen zwei- oder dreiwertigen Metallionen, wie beispielsweise Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Co^{3+} , Cr^{3+} , Ti^{3+} , Mo^{2+} , Mn^{2+} und Cu^{2+} , enthalten.

Das eingesetzte Polymer kann dem Bereich der synthetischen Polymere entstammen. Dafür kommen prinzipiell Polymere in Frage, die über Heteroatome oder funktionelle Gruppen verfügen, die bindende Wechselwirkungen zu Metallionen eingehen können, wie unter anderem Polyole, Polyamine, Polyether, Polyester, Polyamide sowie davon abgeleitete Derivate, Copolymere und Blends.

Andererseits kann das Polymer auch aus der Gruppe der Biopolymere und hier insbesondere aus dem Bereich der Polysaccharide gewählt werden. Dabei kommen sowohl natürliche als auch derivatisierte Polysaccharide in Betracht. Unter den Polysacchariden weisen eine Reihe von Vertretern eine ausgeprägte Affinität zu Schwermetallionen, insbesondere auch Eisenionen, auf.

Zu diesen Vertretern zählt auch das Dextran, das zudem den Vorteil bietet, weniger als andere natürliche Polysaccharide (z. B. Stärke) Qualitätsschwankungen zu unterliegen, was wiederum für die Reproduzierbarkeit der Partikelchargen von

großem Wert ist. Ebenso ist eine Derivatisierung des Dextrans in vielfältiger Weise ausführbar. Nach an sich bekannten Methode können so funktionelle Gruppen (COOH, NH₂, ...), Spacer mit funktionellen Gruppen (Polyethylenglykol-basierte COOH- oder NH₂-Gruppen) oder biochemisch relevante Substrukturen (Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Peptide, Proteine sowie Antikörper und Enzyme) eingeführt werden. Die Derivatisierung des Dextrans kann aber auch genutzt werden, um metallelektive Chelatoren, beispielsweise für die Fixierung von Radionukliden, oder pharmazeutischen Wirkstoffen zu binden.

Als Technologie zur Herstellung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanopartikel hat sich die Hochdruckhomogenisation unter Verwendung des MicrofluidizerTM vom Typ M-110Y bewährt. Dabei werden die Komponenten Metalloxid und Polymer in einem Trägermedium, in den meisten Fällen wird Wasser verwendet, bei Drücken im Bereich von 500 bar bis 1200 bar unter Anwendung hoher Scherkräfte prozessiert. Das Verfahren kann auch dadurch modifiziert werden, dass die Metalloxide erst während der Ultrahomogenisation aus entsprechenden Metallsalzen oder -hydroxiden in situ generiert werden. In diesen Fällen wird ein alkalisches Trägermedium, beispielsweise eine wässrige Ammoniaklösung verwendet.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die Hochdruckhomogenisierung der Komponenten Metalloxid und Polymer in einem Trägermedium nicht nur zu kolloidal stabilen Magnetpartikel-Population im Durchmesserbereich unterhalb von 200 nm führt, sondern dass die erzeugten magnetischen Nanopartikel bei kleinen Magnetfeldstärken unter 50 Oe über größere magnetische Momente verfügen als sie für das als Ausgangsmaterial verwendete Metalloxid bestimmt wurden (Abb. 1).

Die Auswirkung der verbesserten Magneteigenschaften auf die Magnetomobilität wird beim Vergleich der ermittelten Werte für die erfindungsgemäß hergestellten magnetischen Nanopartikeln mit herkömmlichen superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (SPIO) deutlich (Abb. 2). Die nach den Beispielen 1 bis 5 gewonnenen magnetischen Nanopartikel weisen durchweg wesentlich höhere Magnetomobilitäten als vergleichbare SPIO-Partikel (analog US 4452773, Partikeldurchmesser: 100 nm) auf.

Die erfindungsgemäß hergestellten magnetischen Nanopartikel können für diverse Life-Sciences-Applikationen eingesetzt werden. So sind sie besonders für Anwendungen auf bioanalytischem und diagnostischem Gebiet, bei

Bioseparationsprozessen und als Trägermaterial im High-Throughput-Screening geeignet. Der geringe Durchmesser in Verbindung mit der ausgeprägten kolloidalen Stabilität erlaubt darüber hinaus auch ihren Einsatz bei in vivo-Anwendungen, beispielsweise in Form von injizierbaren Kontrastmitteln, Radionuklid-Carriern oder Wirkstoffdepots. Für solche Applikationen ist es von besonderem Vorteil, dass die erfindungsgemäßen Partikel durch Sterilfiltration aufbereitet werden können. Die Erfindung soll anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

Beispiel 1.

36 g Dextran (MW = 40.000 D, Fluka) wurden in 120 ml Wasser gelöst. 180 ml einer 2,5% (w/w) wässrigen Magnetitsuspension (micromod, 45-00-202, Partikeldurchmesser: 200 nm) wurde auf 40°C erwärmt und 10 min bei 500 bar im Microfluidizer M-110Y ultrahomogenisiert. Nach Druckerhöhung auf 1000 bar wurde die auf 40°C erwärmte Dextranlösung zur ultrahomogenisierten Magnetitsuspension gegeben. Die Dextran-Magnetit-Suspension wurde 20 min bei 1000 bar und 90°C ultrahomogenisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die erhaltenen magnetischen Nanopartikel zur Abtrennung des Dextranüberschusses 15 min am Permanentmagneten separiert und in 40 ml Wasser resuspendiert. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 130-140 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 58-62 % (w/w).

Beispiel 2.

Die Partikelsynthese wurde analog Beispiel 1. durchgeführt, wobei der Druck während der gesamten Ultrahomogenisation 500 bar betrug. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 160-180 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 58-62 % (w/w).

Beispiel 3.

Die Partikelsynthese wurde analog Beispiel 1. durchgeführt, wobei das Massenverhältnis zwischen Dextran und Magnetit von 8:1 (Beispiel 1) auf 12:1 erhöht wurde. Dazu wurden 54 g Dextran (MW = 40.000 D, Fluka) in 180 ml Wasser

gelöst. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 130-140 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 52-56 % (w/w).

Beispiel 4.

12 g Ethylenimin-Polymerlösung (50% (v/v), MW = 800 - 1.000 kD, Fluka) wurde mit 30 ml Wasser gemischt. 60 ml einer 2,5% (w/w) wässrigen Magnetitsuspension (micromod, 45-00-202, Partikeldurchmesser: 200 nm) wurde auf 40°C erwärmt und 10 min bei 500 bar im Microfluidizer M-110Y ultrahomogenisiert. Nach Druckerhöhung auf 1000 bar wurde die auf 40°C erwärmte Ethylenimin-Polymerlösung zur ultrahomogenisierten Magnetitsuspension gegeben. Die Polyethylenimin-Magnetit-Suspension wurde 20 min bei 1000 bar und 90°C ultrahomogenisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die erhaltenen magnetischen Nanopartikel zur Abtrennung des Polymerüberschusses 15 min am Permanentmagneten separiert und in 25 ml Wasser resuspendiert. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 80 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 60-65 % (w/w).

Beispiel 5.

72 g Dextran (MW = 40.000 D, Fluka) wurden in 180 ml Wasser gelöst. 90 ml einer 1,5% (w/w) wässrigen Maghemitsuspension (hergestellt nach: M. Holmes et al., J. Magn. Magn. Mater. 122, 134 (1993), Partikeldurchmesser: 20 nm, pH= 1.6 – 2.0) wurde auf 40°C erwärmt und 5 min bei 500 bar im Microfluidizer M-110Y ultrahomogenisiert. Nach Zugabe der auf 40°C erwärmten Dextranlösung zur ultrahomogenisierten Maghemitsuspension wurde die Suspension durch Zugabe von 120 ml 0.1 M Natronlauge neutralisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die erhaltenen magnetischen Nanopartikel mittels Hochgradientenmagnetfeld mit Wasser gewaschen. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 60-70 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 50-52 % (w/w).

Beispiel 6.

Zur Funktionalisierung mit terminalen Carbonsäuregruppen über einen Ethylenglycol-Spacer wurden 20 ml einer 5 % (w/w) Dextran-Magnetit-Nanopartikel-Suspension aus Beispiel 1 (Partikeldurchmesser: 130-140 nm) mit 5 ml 0,5 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,3) gemischt. 120 mg N-Ethyl-N'-(3—dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid und 120 mg 3,6-Dioxaoctandisäure wurden in je 5 ml 0,1 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,3) gelöst und vereinigt. Nach Inkubation dieser Lösung für 10 min bei 50°C erfolgte die Zugabe zur Nanopartikel-Suspension. Die Partikelsuspension wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Separation am Permanentmagneten wurden die Nanopartikel in Wasser resuspendiert. Für die Dichte an Carbonsäuregruppen auf der Partikeloberfläche wurde ein Wert von 40-50 nmol/mg mittels Strömungspotenzialmessung bestimmt (Polyelektrolyttitration gegen 0,001 N Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)-Lösung, Mutek PCD 03 pH). Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 120-130 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 60-65 % (w/w).

Beispiel 7.

Zur kovalenten Bindung von Streptavidin auf der Partikeloberfläche wurden 10 ml einer 2 % (w/w) Dextran-Magnetit-Nanopartikel-Suspension aus Beispiel 7 mit terminalen Carbonsäuregruppen auf der Partikeloberfläche mit 2,5 ml 0,5 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,3) gemischt. 20 mg N-Ethyl-N'-(3—dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid und 40 mg N-Hydroxysuccinimid wurden in je 1 ml 0,1 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,3) gelöst und zur Nanopartikel-Suspension gegeben. Die Partikelsuspension wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Separation am Permanentmagneten wurden die Nanopartikel in 10 ml 0,1 M 2-Morpholino-ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,3) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg Streptavidin (Molecular Probes) wurde die partikelsuspension 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Absättigung reaktiver Stellen wurde die Partikel-Suspension nach Zugabe von 2 ml 0,4 M Glycinlösung eine weitere Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Separation am

Permanentmagneten wurden die Nanopartikel einmal mit 10 ml PBS-Puffer (pH=7,4) gewaschen und in 5 ml PBS-Puffer (pH=7,4) resuspendiert. Die Konzentration an kovalent gebundenem Streptavidin auf den Dextran-Magnetit-Nanopartikeln beträgt 1,5-2 µg Streptavidin pro mg Partikel. Der hydrodynamische Durchmesser der resultierenden magnetischen Nanopartikel beträgt 130-140 nm (Photonenkorrelationsspektroskopie, Zetasizer 3000, Malvern Instr.). Der Eisenanteil in den Partikeln beträgt 60-65 % (w/w).

Magnetisierung

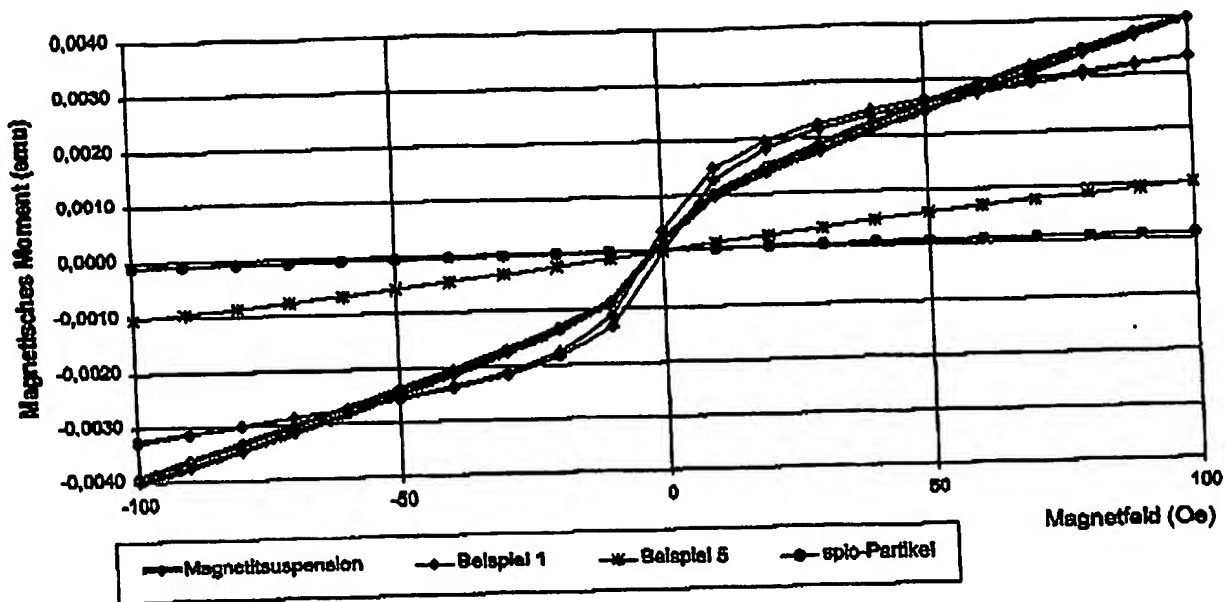


Abbildung 1. Messung der Magnetisierung von je 0,3 mg Partikel in 60 μ l Suspension.

Magnetomobilität der Nanopartikel

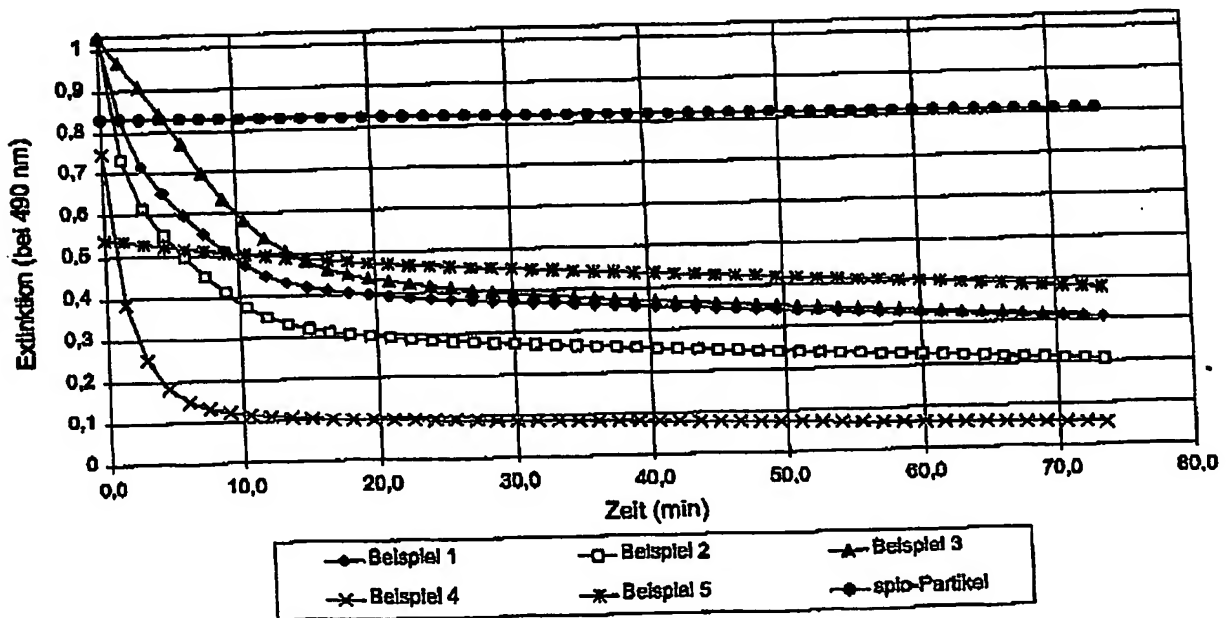


Abbildung 2. Messung der Extinktionsabnahme der Nanopartikelsuspensionen (Beispiele 1 - 5) durch Separation der Partikel an einem Permanentmagneten in Abhängigkeit von der Zeit (Wellenlänge: 490 nm, Eisenkonzentration der Partikelsuspensionen: 60 - 70 μ g/ml).

Patentansprüche

1. Magnetische Nanopartikel bestehend aus Metalloxiden und einem Polymer, gekennzeichnet dadurch, dass sie
 - a) 50 oder mehr Masseprozent Metall enthalten,
 - b) hydrodynamische Durchmesser unterhalb von 200 nm aufweisen,
 - c) bei kleinen Magnetfeldstärken eine höhere Magnetisierung als das eingesetzte Metalloxid aufweisen und
 - d) durch Hochdruckhomogenisation erzeugt werden.
2. Magnetische Nanopartikel nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass sie in Wasser und wässrigen Lösungen ohne Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes ein langzeitstabiles Kolloid bilden.
3. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, dass sie mit Permanentmagneten separierbar sind.
4. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei den Metalloxiden um Eisenoxide, wie Magnetit oder Maghemit oder entsprechende Mischphasen handelt.
5. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 4, gekennzeichnet dadurch, dass die Eisenoxide Anteile an anderen zwei- oder dreiwertigen Metallionen besitzen.
6. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei dem Polymer um ein synthetisches Polymer handelt.
7. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei dem Polymer um ein natürliches oder derivatisiertes Polysaccharid handelt.
8. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 7, gekennzeichnet dadurch, dass es sich bei dem Polysaccharid um Dextran handelt.
9. Magnetische Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 8, gekennzeichnet dadurch, dass das Dextran durch funktionelle Gruppen oder Substrukturen derivatisiert ist.

10. Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 9, gekennzeichnet dadurch, dass die Komponenten Polymer und Metalloxid in einem Trägermedium bei Drücken von 500 bar oder darüber ultrahomogenisiert werden.
11. Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, dass als Trägermedium Wasser verwendet wird.
12. Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel nach den Ansprüchen 1 bis 9, gekennzeichnet dadurch, dass die Komponente Metalloxid in situ aus entsprechenden Metallsalzen oder -hydroxiden erzeugt wird.
13. Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel nach Anspruch 12, gekennzeichnet dadurch, dass das Trägermedium alkalisch ist.
14. Verfahren zur Herstellung magnetischer Nanopartikel nach den Ansprüchen 12 und 13, gekennzeichnet dadurch, dass es sich beim Trägermedium um eine Lösung von Ammoniak in Wasser handelt.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.